

文章编号:1004-7220(2011)03-0252-04

大鼠皮质骨上机械性显微损伤的修复机制研究

宋国路¹, 于志锋¹, 裘世静², 汤亭亭¹

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院 骨科, 上海市骨科内植物重点实验室, 上海 200011;

2. Bone and Mineral Research Laboratory, Henry Ford Hospital, Detroit 48202, USA)

摘要: **目的** 研究大鼠皮质骨上植入物造成的机械性显微损伤的修复机制。**方法** 30只SD大鼠随机分为两组, 一组行卵巢切除术, 另一组行假手术。3个月后在右侧胫骨行钻孔术, 分别于钻孔后1、2、4周后处死, 处死前注射四环素和钙黄绿素进行标记。将含有钻孔的骨段(1 cm)应用大块碱性品红染色, 甲基丙烯酸甲酯包埋后切成约50 μm厚的切片。应用Bioquant图象分析系统对切片进行骨形态计量学分析。**结果** 去卵巢大鼠和假手术大鼠都出现了与显微损伤有关的骨吸收腔, 其中去卵巢组的孔隙率和骨吸收腔明显高于假手术组($P < 0.05$); 随着术后时间的延长, 吸收腔的数目逐渐增加, 各时间点之间的差异有明显的统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 去卵巢大鼠的孔隙率和骨吸收腔数明显高于假手术大鼠, 反映了在雌激素缺乏和较多裂纹形成两种因素刺激下, 去卵巢大鼠皮质骨内的重建更为活跃, 这会降低骨的强度从而增加骨折的危险性。

关键词: 机械性显微损伤; 骨重建; 皮质骨; 孔隙率; 裂纹; 骨折; 大鼠

中图分类号: R 318.01 **文献标志码:** A

Repairing mechanism of mechanical microdamage in the cortical bone of rats

SONG Guo-Lu¹, YU Zhi-feng¹, QIU Shi-jing², TANG Ting-ting¹ (1. Shanghai Key Laboratory of Orthopaedic Implant, Department of Orthopaedic Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao-tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2. Bone and Mineral Research Laboratory, Henry Ford Hospital, Detroit 48202, USA)

Abstract: Objective To study the repairing mechanism of mechanical microdamage around implants in the cortical bone of rats. **Methods** Thirty rats were divided into the ovariectomy group (OVX) and the sham group. At three months after the ovariectomy, a hole was drilled in the right tibial diaphysis by a metal pin. The rats were executed at 1, 2 and 4 weeks, respectively, after the hole drilling. The tetracycline and calcein labeling were performed before the execution. Bone segments containing the hole were stained with the basic fuchsin, embedded in the methylmethacrylate and cut into sections with thickness of 50 μm. Histomorphometric measurement was conducted on bone sections using Bioquant image analysis system. **Results** Bone resorption cavities related to the microdamage occurred in both the OVX rats and the sham-operated rats. The bone porosity and the number of bone resorption cavities were both greater in the OVX rats than that in the sham-operated rats ($P < 0.05$). In addition, the number of bone resorption cavities significantly increased with time after the surgery ($P < 0.05$). **Conclusions** Increased bone porosity and resorption cavities in OVX rats may be related to the crack formation and the estrogen deficiency, which made the bone remodeling in the cortical bone of OVX rats more active. However, remarkably increased resorption cavities would reduce the bone strength and increase the risk of bone fracture.

Key words: Mechanical microdamage; Bone remodeling; Cortical bone; Porosity; Cracks; Fracture; Rats

收稿日期:2011-02-10; 修回日期:2011-04-29

基金项目:上海市科委项目(09dz2200400,08411950500),国家青年自然科学基金项目(11002090),上海市自然科学基金项目(10ZR1417900),上海市教委重点学科建设基金(J50206)。

通讯作者:汤亭亭,教授,博士研究生导师,E-mail:tingtingtang@hotmail.com。

已有报告表明,植入物周围可以产生机械性显微损伤,进而影响植入物的稳定性^[1]。本实验室的观察也发现,皮质骨上植入产生的机械性显微损伤表现为弥散性损伤和线性裂纹两种形式;而随着时间的延长,这些裂纹的数量逐渐减少^[2-3]。那么这些显微损伤是如何被修复的呢? Frost 等^[4]首先提出骨依靠靶向骨重建来清除显微损伤以维持自身结构和力学性能的完整性。最近的研究结果越来越支持这样一种观点,那就是损伤和修复之间存在一种因果关系。一些学者认为骨内存在着两种类型的骨重建:随机性骨重建和靶向骨重建(targeted remodeling)^[5-8],前者不针对特定的部位,而后者针对特定的显微损伤发生的部位。这种骨重建不是随机分布的,而是发生在有显微损伤和骨细胞形态学改变的部位。雌激素缺乏引起的妇女绝经后骨质疏松症在骨质疏松中占有较大比例。在雌激素缺乏的情况下,骨的重建是加快的,这种骨重建的加快是否以及如何影响显微损伤的修复过程,尚未有较深入的研究。因此分析正常和去势大鼠皮质骨骨重建是否被激活,以及在骨重建加快情况下显微损伤的修复情况,可以为骨质疏松症的预防和治疗提供有益参考。

1 材料和方法

1.1 动物

SD 成年雌性大鼠 6 月龄 30 只。体重 400 ~ 450 g, SPF 级动物饲养。

1.2 试剂和仪器

品红(sigma)、四环素(华美生物工程公司)、钙黄绿素(sigma)、钻头(直径 1 mm)、电钻、无菌手术包、2.5% 的戊巴比妥、LEICA-SP1600 硬组织切片机、LEICA 荧光显微镜。

1.3 模型和分组

由于钻孔过程中胫骨断裂及取材时造成的标本损伤,实际纳入分组的动物为 27 只(见表 1)。对第 1、2 周按期处死动物进行单次荧光标记,处死前 3 天腹腔注射四环素(25 mg/kg 体重);4 周按期处死动物进行双次荧光标记,分别于处死前 2 周腹腔注射四环素和处死前 3 天腹腔注射钙黄绿素(10 mg/kg 体重)。

1.4 测量

对钻道周围皮质骨用光镜和荧光显微镜(绿色

和蓝色滤光镜)作同步观察。主要观察荧光标记的情况,同时采用 Bioquant 图像分析系统测量如下的骨重建参数:

- (1) 孔隙率: 孔隙面积(包括吸收腔和血管腔)/总面积;
- (2) 骨吸收腔数;
- (3) 骨吸收腔距表面的平均距离。

表 1 动物分组和取材时间

Tab. 1 Experimental groups and the time interval for evaluation

	1 周	2 周	4 周
卵巢切除组	5	5	5
假手术组	3	5	4

1.5 测量方法

确定测量范围,为距离骨的钻道 1 mm 范围内。先测量血管腔及吸收腔的面积,除以该区域内骨的总面积便可以得到孔隙率;再测量吸收腔的数目及吸收腔距骨表面的距离。

1.6 统计学处理

对两组在不同时间点测量所得数据利用双因素方差分析方法(Two-Way ANOVA)进行统计,以比较各不同时间点及组间的差异情况。结果 P_1 为组间差异, P_2 为时间之间的差异。

2 结果

2.1 形态学观察

在钻孔周围可同时出现弥散性显微损伤和线性裂纹。无论是在去卵巢组还是假手术组,在钻孔后 1 周时,大鼠皮质骨内均只有较少的吸收腔;到钻孔后 2 周、4 周时,吸收腔逐渐增加;4 周时,去卵巢组的吸收腔较假手术组更为明显(见图 1)。这些吸收腔有的与裂纹相通,有的则与裂纹无联系。在钻孔后 1、2 周时,吸收腔内即有活跃的金黄色荧光(四环素)标记,说明已有新骨的沉积;到钻孔后 4 周时,部分吸收腔的内表面可以看到活跃的金黄色荧光和绿色荧光(钙黄绿素)双次标记。

除在吸收腔内表面有活跃的荧光标记外,在部分线性裂纹中也可见荧光标记(见图 2(a)),并与未标记的裂纹延续。部分标记的裂纹(主要是金黄色荧光)和双色标记的吸收腔相通(见图 2(b))。

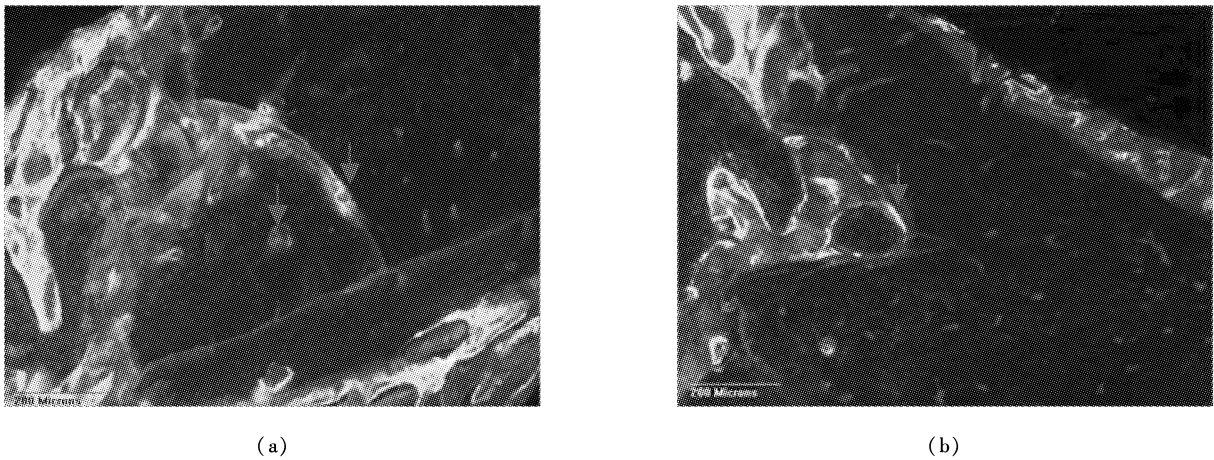


图1 钻孔后4周,去卵巢大鼠钉道周围皮质骨内吸收腔(a)较假手术大鼠(b)更为明显(箭头指示吸收腔及荧光标记情况,10X)

Fig.1 More resorption cavities could be found in the OVX group (a) than in the Sham group (b) at 4th week after the operation (The arrow indicates the resorption cavity and fluorescence labeling, 10X)

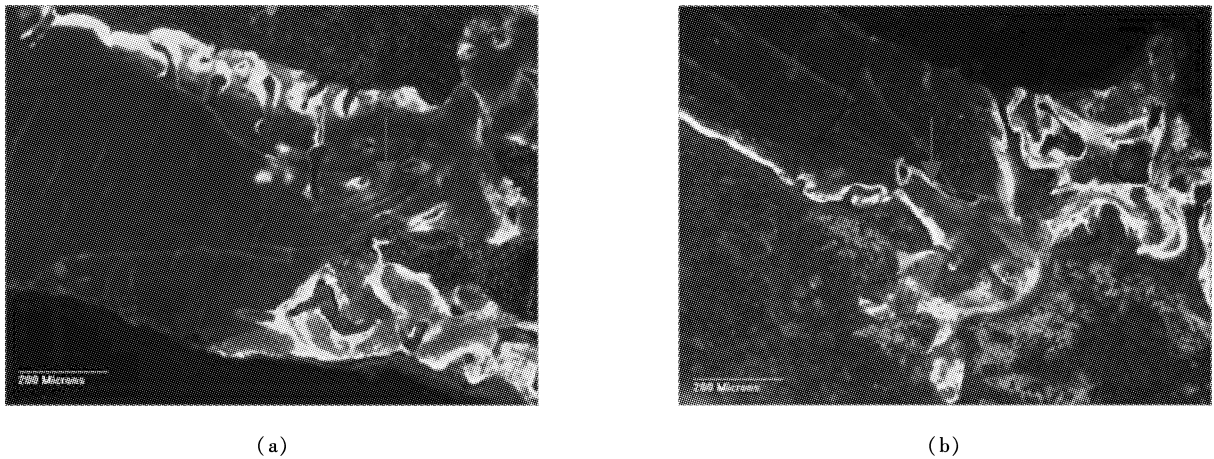


图2 去卵巢大鼠组钻孔后4周,线性裂纹被荧光标记(a)并与吸收腔相通(b)(箭头指示荧光标记,10X)

Fig.2 Linear microcracks were labeled with fluorescence (a) and connected to the resorption cavity (b) at 4th week after the operation in the OVX group (The arrow indicates the fluorescence labeling, 10X)

2.2 统计学结果

对不同组别和时间段的孔隙率和骨吸收腔数的统计学分析发现,孔隙率(见表2)在去卵巢组明显高于假手术组($P < 0.01$);虽然各时间点之间的差异无统计学意义($P > 0.05$),但术后1、2、4周,两组的孔隙率均呈逐渐增加的趋势。

骨的吸收腔数(见表3)在去卵巢组也明显高于假手术组($P < 0.05$),并且随时间延长吸收腔的数目逐渐增加,各时间点之间的差异有明显的统计学意义($P < 0.01$)。

骨吸收腔距表面的平均距离(见表4)在两组间无显著差异,但随着时间的延长,吸收腔距骨表面的

距离越来越远,不同时间点之间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 去卵巢组和假手术组孔隙率的比较

Tab.2 Comparison of porosities between the OVX group and the Sham group

	去卵巢组	假手术组	P_1	P_2
1周	0.0258 ± 0.0047	0.0156 ± 0.0086	<0.01	>0.05
2周	0.0283 ± 0.0153	0.0169 ± 0.0064		
4周	0.0364 ± 0.0130	0.0203 ± 0.0058		

注:数据为均值 ± 标准差,双向方差分析统计, P_1 为组间差异, P_2 为时间之间的差异

表3 去卵巢组和假手术组骨吸收腔数的比较

Tab.3 Comparison of bone absorption lacuna between the OVX group and the Sham group

	去卵巢组	假手术组	P_1	P_2
1周	1.2 ± 1.8	1.0 ± 0.0	<0.05	<0.001
2周	2.0 ± 1.6	1.8 ± 1.1		
4周	10.0 ± 3.4	5.0 ± 2.6		

注:数据为均数 ± 标准差,双向方差分析统计, P_1 为组间差异、 P_2 为时间之间的差异

表4 去卵巢组和假手术组骨吸收腔距表面的平均距离(μm)的比较

Tab.4 Comparisons of the average distance between the bone absorption lacuna and the damage surface in the OVX group and the Sham group

	去卵巢组	假手术组	P_1	P_2
1周	183.94 ± 103.27	232.14 ± 129.37	>0.05	<0.05
2周	371.87 ± 143.37	243.27 ± 62.78		
4周	431.78 ± 69.76	309.41 ± 155.58		

注:数据为均数 ± 标准差,双向方差分析统计, P_1 为组间差异、 P_2 为时间之间的差异

3 讨论

健康的骨具有承载负荷并抵抗骨折的能力。骨受到持续的疲劳载荷后会导致显微损伤的产生。骨具有修复显微损伤的能力,从而维持骨的结构完整性。Frost等^[4]首先提出30~100 μm的显微损伤是由于疲劳载荷引起,他还指出,显微损伤可以激活骨重建来进行修复。破骨细胞会被激活靶向吸收损伤的骨,并由成骨细胞产生新骨进行替代;随后的大量动物实验也肯定了这个观点^[5-8]。疲劳骨折总是伴随着大量骨吸收腔的出现,所以即使修复损伤机制完好,也无法避免吸收腔的出现。随着疲劳损伤时间的延长,只要骨吸收的功能一直大于骨形成,由于吸收腔应力集中导致的显微损伤积累的增加速度会超过修复的速度。这主要取决于有多少显微损伤是被骨吸收功能修复的,以及显微损伤降低骨强度的程度,和显微损伤的积累速度^[9]。当应力水平低于破坏的阈值时,显微损伤的积累和修复最终会达到平衡。

一般认为,在组织学上,根据显微裂纹和骨吸收腔的位置关系,可以分析骨重建与显微损伤的关系。

Burr等^[10]发现在狗皮质骨内,吸收腔和显微裂纹相连。而Bentolila等^[11]发现,在尺骨因受到轴向载荷而产生显微损伤时,皮质内的骨重建就会被激活,在皮质骨内出现正常情况下不存在的次级骨单位。这种骨重建不是随机分布的,而是发生在有显微损伤和骨细胞形态学改变的部位。承受同样的负荷而没有产生显微损伤时,没有出现皮质内的骨重建。这是显微损伤启动骨重建的有力证据。本研究中,无论在去卵巢组还是假手术组,都发现与裂纹相通的吸收腔,并且在吸收腔的内表面有标志新骨形成的荧光标记,说明由于机械性损伤造成的显微裂纹也是通过先吸收后成骨的方式修复的。

另外本研究发现,在靠近骨表面处的吸收腔较多,且与弥散性损伤相邻,说明弥散性损伤也激活了骨的重建。而有报告指出,大鼠尺骨上由于疲劳形成的线性裂纹在10 d后,其数量密度降低了40%;而弥散性损伤的下降则不明显。同时发现在线性裂纹的周围出现了吸收腔,而弥散性损伤的周围没有吸收腔的出现^[11]。这可能与在本模型中,由于钻孔造成的显微损伤靠近骨端,骨髓来源的破骨和成骨细胞的前体容易到达有关。在本研究中,吸收腔距骨端的距离逐渐增加,这可能与靠近骨端的裂纹先被修复,远离骨端的裂纹后被修复有关。

在本研究中,部分吸收腔并不与裂纹相通。Li等^[12]的研究也发现,在组织学切片上,59%的显微裂纹与吸收腔不相连,而90%的吸收腔与裂纹不相连。Martin^[13]认为,由于吸收腔有一定的深度,大多数吸收腔实际上起源于远离切片平面的位置;他假定所有的吸收腔都由显微裂纹所诱发,根据数学模型计算预测,只有少部分吸收腔在切片上会与显微裂纹相连,这与现存的数据吻合。但也存在另外一种可能,即显微裂纹也可通过直接成骨,而不是先吸收后成骨的方式修复。在本研究中,发现部分线性裂纹有荧光标记,这可能是新骨中钙盐沉积的标志。

本研究还发现,在去卵巢组,骨吸收腔明显多于假手术组。虽然这种吸收腔的增加可能由于雌激素缺乏所致,但无论在卵巢切除组织还是假手术组,骨吸收腔均随裂纹产生后的时间而增加,这表明骨吸收与骨显微损伤的出现有关,而雌激素缺乏加强了这种骨重建活动。由于骨重建对显微损伤的修复是

(下转第285页)